第1卷第1期　　动 物 学 研 究　　Vol. 1, No. 1
1980年2月　　ZOOLOGICAL RESEARCH　　Feb., 1980

蛇岛产蝮蛇(*Agkistrodon halys pallas*)蛇毒的柱层析分离及各组分的生理活性测定*

陈苑智　　顾康福**　涂光俦

(沈阳药学院)　(中国科学院昆明动物研究所)

摘　要

应用二乙氨基乙基葡聚糖 A—50 (DEAE-Sephadex A—50) 和盐浓度直线梯度洗脱的方法，对蛇岛产蝮蛇毒进行了柱层析分离，获得16个蛋白峰，并对柱层析的各组分进行了致死活性、出血活性、徐缓激肽释放活性及7种酶活力的测定。

蝮蛇是我国剧毒蛇类中分布最广的一种毒蛇。根据现有资料，蝮蛇在国内21个省、自治区都有分布，且每年都造成蛇伤。

蛇岛位于旅顺港西北25浬的渤海湾中，以盛产蝮蛇闻名。在面积不到一平方公里的小岛上，聚居着数以万计的蝮蛇。蛇岛气候适宜，每年春秋两季路过的候鸟很多，使蝮蛇能获得充足的食物来源，所以岛上的蝮蛇一般个体较大，且敌害很少，繁殖也快，因而数量较多，为开展蝮蛇的综合利用提供了很好的资源。

关于蝮蛇毒的分离纯化，日本大阪大学蛋白质研究所的Suzuki实验室报导较多。自1963年开始，该实验室用二乙氨基乙基纤维素分离日本产蝮蛇(*Agkistrodon halys blomhoffii*)蛇毒得到11—14个蛋白峰，对其中三个蛋白酶组分、三个精氨酸酯酶组分及两个出血毒素还进行了鉴定和纯化[7—9]。

1976年，上海生理研究所第一研究室蛇毒组用二乙氨基乙纤维素分离浙江产蝮蛇(*Agkistrodon halys pallas*)蛇毒，得到5个主要蛋白峰，他们还对其中的神经毒组分用Sephadex G—50进行了进一步纯化[2]。

1978年，涂光俦等应用二乙氨基乙基葡聚糖A—50分离浙江产蝮蛇毒，得到14个蛋白峰，并测定了各组分的酶活性，描述了一个大规模制备蝮蛇毒磷酸二酯酶的简便、经济方法[3]。

本文报导了蛇岛产蝮蛇毒的二乙氨基乙基葡聚糖A—50的柱层析分离结果，对分离

---

* 本工作于1976年完成。

** 现在的通讯地址：上海医学工业研究院。

本文于1979年10月4日收到。

获得的16个蛋白峰的致死活性、出血活性、舒缓激肽释放活性和7种酶活力也进行了测定。

材料和方法

蛇岛产蝮蛇毒系沈阳药学院提供的1975年冰冻干燥粉剂；二乙氨基乙基葡聚糖A—50系上海长征制药厂产品，交换当量3.5±0.5毫克当量/克（干重），100—200目；酶的底物如前文[5]。

其他化学试剂均为国产二级试剂。

蛋白质浓度测定应用在280毫微米和260毫微米的光吸收，按下列公式计算[7]：

蛋白质浓度（毫克/毫升）$=1.45D_{280}-0.74D_{260}$

D_{280}是蛋白质溶液在280毫微米下测得的光密度。

D_{260}是蛋白质溶液在260毫微米下测得的光密度。

致死活性测定：层析各组分经适当稀释后用昆明种小白鼠（体重20±2克）作致死活性测定，每组六只小白鼠，在腹股沟皮下注射0.2毫升样品溶液，于24小时内观察死亡情况。

酶活力测定如前文[5]。

出血活性测定：参考Omori等[8]描述的方法，用豚鼠进行。豚鼠先经背部剪毛，在剪毛部位皮下注射0.1毫升样品溶液（0.1毫克/毫升），24小时后将豚鼠杀死，将皮保持原状并固定在木板上，观察并测量出血斑的大小。

舒缓激肽释放活性测定：参考Rocha e Silva等[2]描述的方法，用豚鼠回肠进行。舒缓激肽原按Suzuki等[11]的方法自新鲜牛血浆中制备。豚鼠回肠的收缩用电动记纹鼓记录。

紫外分光光度计系民主德国Zeiss厂产品，型号Specord US Vis；电动记纹鼓系二医大工厂产品；其他仪器如前文[5]。

结　　果

一、柱层析分离

本文采用的柱层析分离条件是：二乙氨基乙基葡聚糖A—50，用0.01*M* Tris—HCl缓冲液（pH7.5）浸泡装柱并平衡，柱高54厘米，直径2.5厘米。蛇岛产蝮蛇毒700毫克溶于5毫升上述缓冲液中上柱。洗脱分两步进行：第一步用平衡缓冲液洗脱，第二步加NaCl直线梯度洗脱。搅拌瓶：1.200毫升缓冲液，贮存瓶：1.200毫升缓冲液内含0.6*M* NaCl。洗脱液用部分收集器收集，每管4毫升，每小时收集6管。每管直接或经适当稀释后测定280毫微米的光密度，其结果如图[1]。本图表明，蛇岛产蝮蛇毒经二乙氨基乙基葡聚糖A—50柱层析分离后，可得到16个蛋白峰。

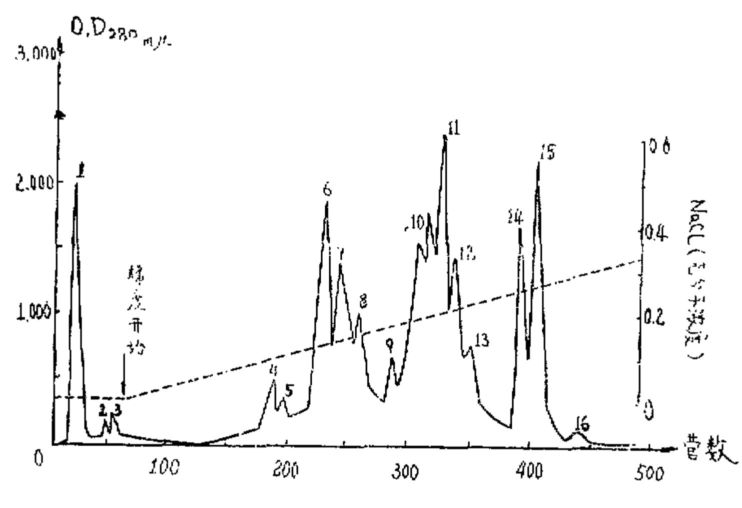


图 1　蛇岛产蝮蛇蛇毒柱层析图谱

二、生理活性的分布：

收集液的各峰主要部分合并后，经适当稀释进行了紫外波段扫描及生理活性的测定，结果如表。

表：分离组分的光谱特征及生理活性与酶活力的分布

峰　　号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
在粗毒的含量(%)	4.4	0.4	0.8	3.0	1.2	9.6	8.4	6.6	3.0	14	11	7.0	4.4	4.7	11	2
O.D280mμ/O.D260mμ	1.79	1.47	1.43	1.32	1.41	1.25	1.63	1.35	1.44	1.59	1.86	1.57	1.55	1.80	1.78	1.41
特征吸收峰(mμ)	279	279	279	281	281	280	283	282	280	279	280	283	282	283	280	280
蛋白水解酶	+++	++	+++	+	+++	+	++	++				+				
精氨酸酯酶							+	++	+	+++	+	++	++	+	+	++++
磷酸单酯酶								+	+++							
磷酸二酯酶		+++	+++	++	+											
L—氨基酸氧化酶									+	+++	+					
核糖核酸酶			++	+												
5′—核苷酸酶		+++	++													
出血活性									++	+++	++	+	+			
致死活性									+++	+++						
运动舒缓素释放活性							+	+++	+++	+			+	+	+++	+++

本表表明，在本文所述柱层析分离条件下，

（1）各组分的特征吸收峰在279—283毫微米之间，$O.D_{280}$与$O.D_{260}$的比值在1.25—1.86之间；

（2）蛋白水解酶的分布较宽，峰1至峰8区段以及峰12都显示蛋白水解酶活力；

（3）精氨酸酯酶的分布较分散，从峰7至峰16都显示精氨酸酯酶的活力，但以峰10和峰16的活力最强；

（4）碱性磷酸单酯酶主要集中在峰9；

（5）磷酸二酯酶主要集中在峰2和峰3，峰4和峰5也有酶活力；

（6）L—氨基酸氧化酶主要集中在峰10，由于此酶含有FAD辅基，故峰10的收集液和冰冻干燥粉末都呈明显的黄色；

（7）核糖核酸酶集中在峰3和峰4；

（8）5′-核苷酸酶集中在峰2和峰3；

（9）出血活性主要分布在峰9至峰13区段，其中以峰10最强，表明与蛋白水解酶的分布在不同区段；

（10）致死活性主要分布在峰9和峰10，其最小全数致死剂量（MLD），每只小白鼠（体重20±2克）为80微克，与粗毒的MLD相近；

（11）舒缓激肽释放活性主要分布在峰8，峰9区段和峰15，峰16区段。

讨　　论

如前文[6]所述，以交联葡聚糖为骨架的离子交换剂，由于既具有离子交换的性能，又具有分子筛效应，加之交换容量比离子交换纤维素大，因此用于蛇毒蛋白的分离，能取得较好的效果。本文应用二乙氨基乙基葡聚糖A—50分离蛇岛产蝮蛇毒，得到16个蛋白峰，较Suzuki实验室[7—9]用二乙氨基乙基纤维素分离日本产蝮蛇毒和上海生理研究所[2]用二乙氨基乙基纤维素分离浙江产蝮蛇毒所获蛋白峰为多。

除选用不同的离子交换剂以外，本文还采用了缓冲溶液加NaCl的一步直线梯度洗脱方法，与Suzuki实验室应用三次醋酸钠凹形梯度洗脱比较，可保证层析过程pH值的稳定，并可简化分离手续。

比较本文同Suzuki实验室[7—9]和涂光俦等人[3]的结果不难看出，日本产蝮蛇毒、蛇岛产蝮蛇毒和浙江产蝮蛇毒的柱层析图谱和各分离组分的生理活性分布是不同的，日本产蝮蛇毒含有三个蛋白水解酶，分别分布在开始、中间和最后的蛋白峰中，蛇岛产蝮蛇毒的蛋白水解酶分布在图谱的前半部，而浙江产蝮蛇毒的蛋白水解酶却分布在图谱的中间和后半部。除蛋白水解酶外，其它诸如精氨酸酯酶、出血活性和5′—核苷酸酶的分布也有区别。这就说明，属同一种但属不同亚种的毒蛇的蛇毒，它们的组成及组分的性质是不相同的，这也为蝮蛇的种下分类提供某些依据[4]。

本文表明，峰1只有蛋白水解酶活力，而不具有其它酶活力和生理活性；L—氨基酸氧化酶和出血活性主要集中在峰10；磷酸二酯酶主要集中在峰2和峰3且与磷酸单酯酶分开；蛋白水解酶与致死活性几乎完全无关。这些结果为蛇岛产蝮蛇毒各组分的毒理

作用研究以及蛇岛产蝮蛇毒的综合利用，提供了一定的资料。

参　考　文　献

1. 潘家秀等，蛋白质化学研究技术，1962年，13页，科学出版社。

2. 上海生理研究所第一研究室，蝮蛇毒的神经毒成份的研究Ⅰ，神经毒素的初步分离，生物化学与生物物理学报，1976年，第8卷，第4期，357页。

3. 涂光俦、冉永禄、武天爱、于力，蛇毒的研究与利用Ⅳ。浙江产蝮蛇(Agkistrodon halys Pallas) 蛇毒的柱层析分离及磷酸二酯酶的大规模纯化，生物化学与生物物理学报，1979年，第11卷，第2期，169页。

4. 伍律，我国蝮蛇种下分类的研究，动物学报，1977年，第23卷，第3期，318页。

5. 云南省动物研究所第四研究室，蛇毒的研究与利用Ⅰ，我国几种常见毒蛇蛇毒酶活力测定，生物化学与生物物理学报，1976年，第8卷，第2期，151页。

6. 云南省动物研究所第四研究室，蛇毒的研究与利用Ⅱ，湖南产眼镜蛇 (Naja naja atra)蛇毒的柱层析分离及各组份的毒性和酶活力测定，生物化学与生物物理学报，1976年，第8卷，第2期，157页。

7. Iwanaga S., et al.1965. Studies on snake venoms 16. Demonstration of a proteinase with hemorrhagic activity in the venom of *Agkistrodon halys blomhoffii*, *ibid*, **57**, 392.

8. Omori T., et al., Relationship between the hemorrhagic and lethal activities of Japanese mamushi (*Agkistrodon halys blomhoffii*) venom, *Toxicon*, 2, 1.

9. Satake M., et ol. 1963. Studies on snake venoms 13. chromatographic separation and properties of three proteinases from *Agkistrodon halys blomhoffii* venom, *J. Biochem.*, **53**, 438.

10. Sato T., et al. 1965. Studies on snake venoms 15. Separation of arginine ester hydrolase of *Agkistrodon halys blomhoffii* venom into three enzymatic entities, "Bradykinin releasing", "Clotting" and "Permeability increasing", *ibid*, **57**, 380.

11. Suzuki T., et al. 1965. Purification of bovine bradykininogen, *J. Biochem.*, **57**, 14.

Identification of Physiological Activities in the Venom of *Agkistrodon halys* (from Snake Island) After Fractionation by Chromatography

Chen Jianzhi, Gu Kangfu Tu Guangchou

(Shenyang College of Pharmacology) (Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica)

Abstract

The venom of *Agkistrodon halys* (from Snake Island) was fractionated on DEAE-Sephadex A—50 into sixteen different fractions. The experimental conditions are described. Some enzymatic activities (arginine ester hydrolase, proteinase, phosphomonoesterase, phosphodiesterase, L-amino acid oxidase, 5′-nucleotidase and ribonuclease) as well as lethal, haemorrhagic and bradykinin releasing activities have been determined for each fraction.